

Diagnostyka choroby von Willebranda

Diagnostics of von Willebrand disease

Teresa Iwaniec

II Katedra Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków

Streszczenie

Choroba von Willebranda, najczęstsza wrodzona skaza krwotoczna jest związana z niedoborem lub upośledzeniem funkcji czynnika von Willebranda. Wyróżnia się trzy typy choroby von Willebranda: typ 1 (łagodny, ilościowy), typ 2 (jakościowy) oraz typ 3 (ciężki; całkowity brak czynnika von Willebranda). Rozpoznanie tej jednostki chorobowej obejmuje badanie kliniczne pacjenta oraz panel badań laboratoryjnych (testy przesiewowe, badania wstępne oraz specjalistyczne badania szczegółowe). Z powodu zmienności fizjologicznej stężeń czynnika von Willebranda oraz czynnika VIII (białka ostrej fazy) wyniki badań nie zawsze jednoznacznie wskazują na obecność choroby (szczególnie w typie 1) i dlatego niekiedy konieczne jest kilkakrotne powtarzanie oznaczeń. Istotne znaczenie ma jednak dostęp do wyspecjalizowanego laboratorium oferującego pełny zakres badań diagnostycznych.

Słowa kluczowe: choroba von Willebranda, badania wstępne, badania szczegółowe

J. Transf. Med. 2011; 4: 178–182

Summary

Von Willebrand disease (VWD), the most common inherited bleeding disorder, is caused by quantitative or qualitative von Willebrand factor (vWF) deficiency. Three types of are distinguished: type 1 (quantitative), type 2 (qualitative) and type 3 (severe type; complete absence of vWF). Diagnostics of VWD is based on clinical evaluation and laboratory tests (screening tests, initial tests and specialist tests). Physiologic variability of vWF and factor VIII levels (acute phase proteins) can sometimes hamper the diagnosis, especially of type 1 VWD, and makes repeated testing necessary. Access to specialist laboratory and full range of diagnostic is of utmost importance.

Key words: von Willebrand disease, initial tests, specialist tests

J. Transf. Med. 2011; 4: 178–182

Wstęp

Choroba von Willebranda (VWD, *von Willebrand disease*), najczęstsza wrodzona skaza krwotoczna, jest związana z niedoborem lub upośledzeniem funkcji czynnika von Willebranda (vWF, *von Willebrand factor*), który jest białkiem produkowanym

w komórkach śródbłonna naczyniowego oraz w megakariocytach szpiku kostnego. W osoczu występuje pod postacią różnej wielkości multimetrów: małych (LMW, *low molecular weight*), średnich (IMW, *intermediate molecular weight*) oraz dużych (HMW, *high molecular weight*) rozkładanych przez enzym, metaloproteinazę ADAMTS13 [1].

Tabela 1. Klasyfikacja choroby von Willebranda
Table 1. Classification of von Willebrand disease

Typ VWD	Charakterystyka
Typ 1	Częściowy ilościowy niedobór vWF
Typ 2	Jakościowe zaburzenie funkcji vWF
Podtyp 2A	Osłabienie adhezji płytek krwi zależnej od vWF, selektywny niedobór dużych multimerów
Podtyp 2B	Zwiększenie powinowactwa vWF do płytkowej GP Ib, selektywny niedobór dużych multimerów
Podtyp 2M	Osłabienie adhezji płytek zależnej od vWF przy prawidłowym układzie multimerów
Podtyp 2N	Defekt wiązania FVIII przez vWF
Typ 3	Postać ciężka — brak vWF

vWF (von Willebrand factor) — czynnik von Willebranda

Z uwagi na podwójną rolę vWF w hemostazie (udział w adhezji płytek krwi oraz stabilizacja czynnika VIII) skaza krwotoczna w przebiegu VWD ma charakter mieszany, płytkowo-osoczkowy. Rozpoznanie tej skazy nie jest proste, między innymi z uwagi na fakt, że w większości przypadków VWD wyniki podstawowych badań układu hemostazy są prawidłowe (liczba płytek krwi, czas częściowej tromboplastyny po aktywacji, czas protrombinowy, czas trombinowy, stężenie fibrynogenu).

Aktualnie obowiązująca klasyfikacja VWD opiera się na zmodyfikowanych w 2006 roku kryteriach *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (tab. 1) [2]. Wyróżnia ona trzy typy VWD. Typ pierwszy, występujący najczęściej (ok. 60–80% przypadków), jest związany ze zmniejszeniem aktywności i stężenia vWF w osoczu. Typ drugi (jakościowy), najbardziej heterogenny, wiąże się z produkcją dysfunkcyjnego vWF (ok. 10–30% przypadków). W typie 2 wyróżnia się kilka podtypów (2A, 2B, 2M, 2N), w zależności od rodzaju zaburzeń czynnościowych w obrębie cząsteczki vWF. Najrzadziej występuje typ trzeci (ciężki, ok. 1–5% przypadków), w którym obserwuje się całkowity niedobór vWF.

Poniżej przedstawiono dostępne metody diagnostyczne, stosowane w rozpoznawaniu choroby von Willebranda, w kontekście aktualnych zaleceń światowych oraz polskich.

Diagnostyka laboratoryjna

Algorytm postępowania diagnostycznego w rozpoznawaniu VWD przedstawiono w zaleceniach Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów z 2008 roku [3]. Obejmuje on, po

wstępnym badaniu klinicznym pacjenta, laboratoryjne testy przesiewowe, badania wstępne oraz specjalistyczne badania szczegółowe.

Badania podstawowe (przesiewowe) to morfologia krwi z liczbą płytek, czas protrombinowy (PT, *prothrombin time*), czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT, *activated partial thromboplastin time*), stężenie fibrynogenu oraz czas trombinowy (TT, *thrombin time*). Do badań podstawowych zalicza się również to dotyczące czasu krwawienia (BT, *bleeding time*), które jednak z uwagi na małą swoistość i niską powtarzalność praktycznie nie jest już wykonywane i bywa w niektórych ośrodkach zastępowane pomiarem czasu okluzji (czasu zamknięcia) w aparacie PFA-100. Czas okluzji (CT, *closure time*) to parametr oceniający w warunkach *in vitro* łącznie adhezję i agregację płytek krwi. Jest mierzony do całkowitego zamknięcia otworu w membranie opłaszczonej kolagenem i ADP lub epinefryną [4]. Nieprawidłowy CT (czas zamknięcia są wydłużone) występuje u większości pacjentów z VWD (ok. 85–90%), z wyjątkiem podtypu 2N [5]. Parametr ten jest bardzo czuły, jednak mało swoisty. Występuje także u pacjentów z trombastenią Glanzmanna, małopłytkowością oraz podczas stosowania leków blokujących funkcję płytek krwi, na przykład kwasu acetylosalicylowego (aspiryny). Trzeba pamiętać, że prawidłowy czas okluzji nie wyklucza VWD [5].

Wartości PT, TT oraz stężenie fibrynogenu są u chorych z VWD prawidłowe, natomiast aPTT może ulec przedłużeniu w przypadku, gdy jest obniżona aktywność czynnika VIII (podtyp 2N, typ 3 VWD oraz część chorych na typ 1 i typ 2). Liczba płytek krwi jest prawidłowa poza częścią przypadków podtypu 2B, typowo obniżająca się w ciąży, podczas infekcji, stresu [6].

Badania wstępne w kierunku vWF to ocena aktywności czynnika VIII (FVIII:C), aktywności ko-faktora ristocetyny (vWF:RCo, aktywność vWF) oraz stężenia czynnika von Willebranda (vWF:Ag, antygen vWF) [3]. Aktywność czynnika VIII oznaczana metodą jednostopniową (czyli jako modyfikacja czasu aPTT), rzadziej metodą dwustopniową (chromogenną), jest najczęściej prawidłowa (N: 50–150%). Obniżenie aktywności czynnika VIII obserwuje się jedynie w VWD typu 3 (zwykle poniżej 10%) oraz w podtypie 2N, czasem u niektórych chorych z typem 1 i 2. Stężenie czynnika von Willebranda (N: 50–150%) można oznaczać kilkoma metodami immunologicznymi, na przykład ELISA (immunoenzymatyczną; *enzyme-linked immunosorbent assay*), EIFA (enzymimmuno fluorescencyjną; *enzyme immunofluorescent assay*) lub LIA (*automated*

Tabela 2. Badania szczegółowe w rozpoznawaniu podtypów typu 2 choroby von Willebranda

Table 2. The specific diagnostics tests for subtypes of type 2 von Willebrand disease

	Charakterystyka	Badania diagnostyczne
Podtyp 2A	Oslabienie adhezji płytek krwi zależnej od vWF, selektywny niedobór dużych multimerów	Analiza multimerów
Podtyp 2B	Zwiększenie powinowactwa vWF do płytkowej GP Ib, selektywny niedobór dużych multimerów	Test LD-RIPA Analiza multimerów
Podtyp 2M	Oslabienie adhezji płytek zależnej od vWF przy prawidłowym układzie multimerów	Analiza multimerów
Podtyp 2N	Defekt wiązania FVIII przez vWF	Test wiązania FVIII:vWF

vWF (von Willebrand factor) — czynnik von Willebranda; LD-RIPA (low dose ristocetin induced platelet aggregation) — agregacja płytek pod wpływem niskiego stężenia rystocetyny

latex immuno assay). Wartość vWF:Ag w typie 1 jest obniżona, w typie 2 obniżona lub prawidłowa, natomiast w typie 3 nieoznaczalna. Na podstawie aktywności czynnika von Willebranda mierzonej jako aktywność kofaktora rystocetyny ocenia się zdolność vWF do interakcji z płytkami krwi w obecności rystocetyny. Rystocetyna to antybiotyk, który w warunkach *in vitro* uczestniczy w wiązaniu vWF z glikoproteiną płytkową Ib. Wartość vWF:RCo jest obniżona w typach 1, 2A, 2B, 2M, obniżona lub prawidłowa w typie 2N oraz nieoznaczalna w typie 3 [3].

Na podstawie wyników aktywności i stężenia vWF można obliczyć współczynnik vWF:RCo/vWF:Ag, który jest pomocny w różnicowaniu VWD typu 1 i 2. Wartości powyżej 0,5–0,7 wskazują na typ 1, a wartości poniżej 0,5–0,7 na typ drugi (za wyjątkiem podtypu 2N, w którym wartości są takie, jak w typie 1) [1].

Badaniem, które także może być przydatne w różnicowaniu typu 1 i 2, szczególnie typu 2A od 2M oraz 2A od 2B, jest test wiązania vWF do kolagenu (vWF:CB, *vWF collagen binding*), w którym ocenia się zdolność przyłączania vWF do kolagenu przy współudziale przede wszystkim domeny A3 cząsteczki vWF. Badanie to zalicza się już do specjalistycznych. U niewielkiego procenta pacjentów obecny jest defekt wiązania kolagenu, który jest związany z nieprawidłowościami w obrębie domeny A3 vWF i nie zależy od obecności dużych multimerów. Ponieważ wartość vWF:RCo jest u nich prawidłowa, test vWF:CB wydaje się mieć podstawowe znaczenie dla rozpoznania VWD. Z uwagi jednak na fakt, że wynik testu w dużej mierze zależy od pochodzenia kolagenu, testu nie powinno się wykonywać zamiast testu vWF:RCo [1, 7].

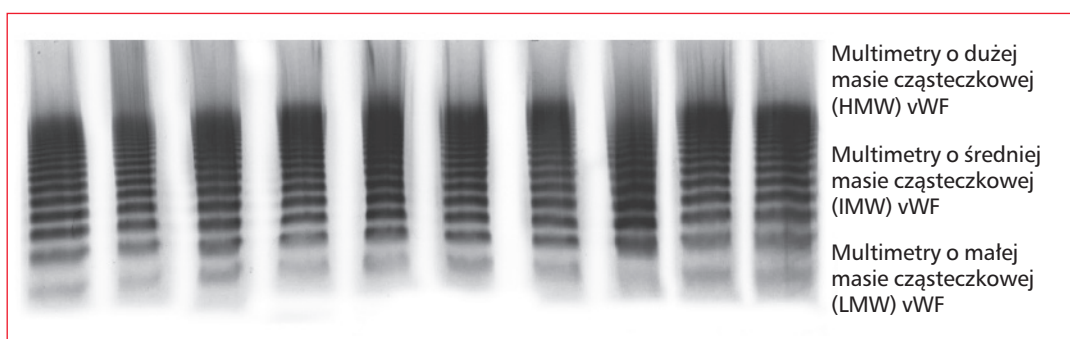
Aby rozpoznać konkretny podtyp w typie 2 (jakościowym), niezbędne jest wykonanie dalszych **badan specjalistycznych**, takich jak: agregacja płytek krwi pod wpływem standardowego stężenia rystocetyny, agregacja płytek pod wpływem niskie-

go stężenia rystocetyny (LD-RIPA, *low dose ristocetin induced platelet aggregation*), test wiązania FVIII przez vWF (vWF:FVIIIb, *vWF:FVIII binding*) oraz analiza multimerów vWF w osoczu (tab. 2) [8]. Niestety, nadal te badania są bardzo trudno dostępne w polskich ośrodkach diagnostycznych.

Badanie agregacji pod wpływem standardowego stężenia rystocetyny (RIPA), tj. 1,1–1,5 mg/ml, ma zastosowanie praktycznie wyłącznie dla rozpoznawania vWD typu 3, w którym jest ona osłabiona. Dla pozostałych typów choroby test jest zbyt mało czuły [1].

Test LD-RIPA, czyli ocena agregacji płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym pod wpływem małego stężenia rystocetyny (0,5–0,6 mg/ml), to badanie wykorzystywane w diagnostyce podtypu 2B vWF. U osób zdrowych płytki krwi obecne w osoczu bogatopłytkowym nie agregują pod wpływem tak niskiego stężenia rystocetyny. U pacjentów z typem 2B obserwuje się natomiast agregację, najczęściej $\geq 30\%$ (wynik dodatni) [3]. Niestety, dodatni wynik tego testu obserwuje się także w płytkowym typie VWD (rzekomej chorobie von Willebranda). Aby rozróżnić te dwie jednostki chorobowe, można wykonać tak zwany mieszany test LD-RIPA (stosuje się mieszaninę osocza pacjenta i płytki od zdrowego dawcy — prawidłowe wartości testu wskazują na typ płytkowy). Przydatny jest także test wiązania vWF do płytek (vWF:PB, *vWF platelet binding*) oceniający przyłączanie vWF do utrwalonych w paraformaldehydzie prawidłowych płytek krwi pod wpływem rystocetyny w stężeniu 0,3–0,6 mg/ml (w typie 2B wiązanie jest wzmożone, a w typie płytkowym — prawidłowe) [3].

Test wiązania FVIII przez vWF (vWF:FVIIIb; *FVIII binding capacity of vWF*) jest niezbędny do rozpoznania typu 2N VWD i zróżnicowania tego podtypu od łagodnej hemofilii A. W teście określa się zdolność vWF do przyłączania egzogenego czynnika VIII (metodą immunoenzymatyczną lub chromogenną mierzy się ilość związanego FVIII).



Rycina 1. Prawidłowy wzór multimetrów czynnika von Willebranda (vWF) w zdrowym osoczu kontrolnym (rozdział wykonano metodą elektroforezy na 1,5-procentowym żelu agarozowym; materiał własny)

Figure 1. The pattern of von Willebrand factor (vWF) multimers in normal plasma (multimers were analyzed using medium resolution gel, 1,5% agarose)

Zaleca się także, aby w przypadku podejrzenia VWD typu 2N dla określenia aktywności czynnika VIII stosować metodę dwustopniową (chromogenną) zamiast metody jednostopniowej [9].

Analiza multimetrów jest testem jakościowym oceniającym rozdział multimetrów vWF. Metoda ma podstawowe znaczenie dla rozpoznania podtypów typu 2 VWD. Jak już wspomniano, cząsteczka vWF jest zbudowana z różnej wielkości multimetrów: małych, średnich i dużych, które wędrują w żelu agarozowym z różną prędkością (najwolniej wędrują multimetry o dużej masie cząsteczkowej). Najczęściej stosowane techniki rozdziału multimetrów to elektroforeza w żelu agarozowym (1,4% lub 3%; *horizontal SDS-gel electrophoresis*) lub poliakrylamidowym (5%; *vertical SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) [10]. Po rozdzieleniu wykonuje się immunoblotting, a następnie uwidocznienie białek. Do procesu wizualizacji wykorzystuje się techniki: radioaktywną (z wykorzystaniem mono- lub poliklonalnych przeciwciał sprzężonych z izotopem jodu ^{125}I), chemiluminescencyjną, fluoroscencyjną lub kolorymetryczną [11].

Ponieważ uzyskany wzór multimerów pozwala tylko na ocenę jakościową (przez porównanie z osoczem prawidłowym [ryc. 1]) dla pełnej wizualizacji i oceny ilościowej prążków po rozdzieleniu elektroforetycznym można wykorzystać przekształcenie (skanowanie) densytometryczne.

W poszczególnych typach choroby von Willebranda, szczególnie w typie 2, wzory multimetrów różnią się, co pozwala na wykorzystanie tej techniki w ich różnicowaniu. W podtypie 2A i 2B obserwuje się selektywny niedobór dużych multimetrów, natomiast w podtypie 2M rozkład multimerów jest prawidłowy, podobnie jak w typie 1. Także typ płytkowy VWD charakteryzuje się redukcją dużych multimetrów w osoczu. W typie Vincenza (klasyfi-

kowanym obecnie jako typ 1 lub podtyp 2M) występują w osoczu multimetry, które są zbliżone wielkością do tak zwanych olbrzymich (ULMW, *ultra-large*) obecnych w płytkach krwi [12]. Multimetry olbrzymie pojawiają się także w osoczu pacjentów z zakrzepową plamicą małopłytkową (TTP, *thrombotic thrombocytopenic purpura*), w których to przypadkach nie wykonuje się rutynowo tego testu.

Analiza multimerów jest badaniem bardzo przydatnym, szczególnie w sytuacjach, w których wyniki badań podstawowych i wstępnych nie wskazują jednoznacznie na typ lub podtyp choroby von Willebranda. Badanie jest niestety kosztowne i wymaga standaryzacji. Ośrodki, które je wykonują, korzystają z własnych modyfikacji metod już wcześniej opisanych, co może być powodem rozbieżności w ocenie uzyskanych wyników.

Ponadto badania genetyczne (sekwencjonowanie DNA) czasami są wykorzystywane w diagnostyce choroby von Willebranda, szczególnie w diagnozowaniu podtypów typu 2. Większość opisanych mutacji jest związana z określonymi podtypami 2 typu choroby. Są to jednak badania kosztowne i trudno dostępne [1].

Trudności diagnostyczne

O ile rozpoznanie typu 3 i ogólnie typu 2 VWD nie jest zwykle trudne, o tyle w przypadku typu 1 (łagodnego) wyniki badań nie zawsze dają jednoznaczną odpowiedź. Badania przesiewowe w tym typie są najczęściej prawidłowe. Badania wstępne w łagodnej postaci VWD mogą także okresowo wypadać prawidłowo. Należy pamiętać, że czynnik VIII i czynnik von Willebranda to białka ostrej fazy, tak więc ich stężenie we krwi rośnie między innymi podczas stresu, wysiłku fizycznego, stanu zapalne-

go, zabiegów operacyjnych. Stężenie tych białek zwiększa się także z wiekiem oraz podczas ciąży (w trzecim trymestrze mogą osiągać wartości 2–5 razy wyższe od wyjściowych), co powoduje, że badania laboratoryjne u niektórych pacjentów trzeba wykonywać kilkakrotnie. Z kolei u osób z grupą krwi 0 stężenie vWF jest fizjologicznie o około 25–30% niższe niż u osób z grupą krwi A i B.

Badania laboratoryjne o podstawowym znaczeniu w rozpoznaniu VWD są nadal słabo wystandaryzowane i cechują się dużą zmiennością, na przykład współczynnik zmienności (CV, *coefficient of variation*) dla vWF:RCo może się wahać w granicach 20–30% lub nawet więcej (szczególnie przy wartościach poniżej 10%), a dla vWF:Ag — 10–20% [1]. Tak duża zmienność powoduje, że wyniki uzyskane w różnych laboratoriach mogą utrudniać postawienie właściwego rozpoznania [13].

W takiej sytuacji sugeruje się przede wszystkim oznaczenia z tej samej próbki krwi oraz dbałość o właściwy sposób transportowania materiału do badania.

Podsumowanie

Zalecenia Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów, opublikowane w 2008 roku, precyzują sposób postępowania przy rozpoznawaniu choroby von Willebranda. Aby postawić ostateczne rozpoznanie, po badaniu klinicznym pacjenta należy wykonać badania laboratoryjne w odpowiedniej kolejności. Badania podstawowe (PT, aPTT, fibrynogen, morfologia), chociaż powszechnie dostępne, w większości przypadków VWD wypadają prawidłowo. U chorego z objawami skazy krwotocznej zaniechanie dalszej diagnostyki w tym momencie jest błędem. Niekiedy (np. w przypadku typu 1 VWD) konieczne bywa kilkakrotne powtórzenie oznaczeń. Kluczowe znaczenie ma jednak dostęp do wyspecjalizowanego laboratorium, wykonującego pełny panel oznaczeń laboratoryjnych. Istotnymi utrudnieniami w diagnostyce VWD jest nadal mała

dostępność wyżej wymienionych badań, zwłaszcza specjalistycznych (np. LD-RIPA, analiza multimerów, vWF:FVIIIB) oraz ich wysoki koszt.

Piśmiennictwo

1. National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI): The diagnosis, evaluation and management of von Willebrand disease. Bethesda (MD), U.S. Department of Health and Human Services 2007.
2. Sadler J.E., Budde U., Eikenboom J.C. i wsp. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4 (10): 2103–2114.
3. Zdziarska J., Chojnowski K., Klukowska A. i wsp. Postępowanie w chorobie von Willebranda. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów 2008. *Medycyna Praktyczna*; wydanie specjalne 2008; 12.
4. Barrowcliffe T.W., Cattaneo M., Podda G.M. i wsp. New approaches for measuring coagulation. *Haemophilia* 2006; 12: 76–81.
5. Favaloro E.J. The utility of the PFA-100 in the identification of von Willebrand disease: a concise review. *Semin. Thromb. Hemost.* 2006; 32: 537–545.
6. Federici A.B., Mannucci P.M., Castaman G. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. *Blood* 2009; 15: 526–534.
7. Baronciani L., Federici A.B., Cozzi G., Canciani T., Mannucci P.M. von Willebrand factor collagen binding assay in von Willebrand disease type 2A, 2B and 2M. *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4: 2088–2090.
8. Budde U. Diagnosis of von Willebrand disease subtypes: implications for treatment. *Haemophilia* 2008; 14 (supl. 5): 27–38.
9. Rodgers S.E., Lerda N.V., Favaloro E.J. i wsp. Identification of von Willebrand Disease Type 2N (Normandy) in Australia. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002; 118: 269–276.
10. Nishino M., Girma J.P., Rothschild C., Frerking E., Mayer D. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* 1989; 74: 1591–1599.
11. Ledford-Kraemer M.R. Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis. *Am. J. Hematol.* 2010; 85: 510–514.
12. Chojnowski K., Klukowska A., Łętowska M. i wsp. Zasady postępowania we wrodzonych zaburzeniach czynności płytek krwi. *Acta Haematol. Pol.* 2009; 40 (3): 731–752.
13. Favaloro E.J., Bonar R., Kershaw G. i wsp. Laboratory diagnosis of von Willebrand's disorder: Quality and diagnostic improvements driven by peer review in a multilaboratory test process. *Haemophilia* 2004; 10: 232–242.